



**Universitat Autònoma de Barcelona**

Facultat de Veterinària

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Màster Oficial de Qualitat d'Aliments d'Origen Animal

**AVALUACIÓ DEL DANY SUBLETAL EN *LISTERIA*  
*MONOCYTOGENES* TRACTADA PER ALTA PRESSIÓ  
HIDROSTÀTICA**

Montserrat Pérez Abelaira

3 de Juliol del 2019

Marta Capellas Puig, professora titular, i Alicia Subires Orenes, investigadora postdoctoral del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona,

## INFORMEN

Que el treball d'investigació titulat “Avaluació del dany subletal en *Listeria monocytogenes* tractada per alta pressió hidrostàtica” ha estat realitzat sota la nostra supervisió dins del mòdul Treball de Fi de Máster del Máster Oficial de Qualitat d’Aliments d’Origen Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Marta Capellas Puig

Alicia Subires Orenes

Montserrat Pérez Abelaira

Facultat de Veterinària, 3 de Juliol del 2019

## **Agraïments**

Després de mesos d'aprenentatge i d'esforç es poden escriure aquests agraïments.

Primerament, a l'Alicia i la Marta, pel seu constant suport, exigència, orientació i confiança en aquests mesos. Gràcies per creure en mi des del primer moment i per sempre estar disposades a ajudar-me.

En segon lloc, a tot el personal del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona, pel seu interès en el treball i per considerar-me una més de l'equip.

En tercer lloc, als companys de màster, especialment a l'Ariadna Rubio i l'Adrián Lezcano, per fer-me aquest recorregut més amè i sempre estar al meu costat quan els necessitava.

Finalment, a la meva família, especialment als meus pares i a la meva germana pel seu suport constant al llarg d'aquest treball.

**Llista d'abreviatures**

%DS	Dany subletal	
DO	Densitat òptica	
HHP	Alta pressió hidrostàtica	<i>High hydrostatic pressure</i>
PPS	Solució salina fisiològica	<i>Peptone physiological salt solution</i>
TSA	Agar triptona soja	<i>Tryptone soya agar</i>
TSAYE	Agar triptona soja suplementat amb extracte de llevat	<i>TSA with yeast extract</i>
TSB	Brou de triptona soja	<i>Tryptone soya broth</i>
TSBYE	Brou de triptona soja suplementat amb extracte de llevat	
TSYGB	Brou de triptona soja suplementat amb extracte de llevat i glucosa	
CFU	Unitats formadores de colònies	

# Índex

Abstract .....	1
Resum.....	1
1. Introducció .....	2
2. Materials i Mètodes .....	7
2.1 Soca i condicions de cultiu .....	7
2.2 Calibratge de la densitat òptica amb cèl·lules no tractades .....	7
2.3 Tractaments d'alta pressió hidrostàtica .....	7
2.3.1 Tractament de les mostres.....	7
2.3.2 Avaluació del creixement en medi líquid i sòlid .....	8
2.4 Mètode lineal d'estimació de la fase retardària de cèl·lules individuals.....	9
3. Resultats i Discussió.....	11
3.1 Inactivació i dany subletal de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A tractada a 400 MPa .....	11
3.2 Aplicació del mètode lineal d'estimació de la durada de la fase retardària .....	11
3.2.1 Càlcul de $\mu$ .....	11
3.2.2 Càlcul de $\rho$ .....	12
3.2.3 Càlcul de $Y_{det}$ .....	13
3.2.4 Càlcul de $T_{det}$ .....	14
3.3 Durada de la fase retardària ( $L_g$ ) de cèl·lules individuals de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A tractada a 400 MPa .....	15
4. Conclusions .....	17
5. Bibliografia.....	18

## Abstract

In this work, sublethal injury and recovery ability of *Listeria monocytogenes* Scott A single cells after high hydrostatic pressure (HHP) treatments at 400 MPa and 8°C for 2, 8 and 20 min was evaluated. To this end, the length of the lag phase was estimated from optical density measurements of single-cell suspensions and the corresponding plate counts. The results revealed that the increase in exposure time leads to the appearance of sublethally injured cells needing longer recovery times before multiplication compared to the untreated cells. However, a fraction of resistant cells with a lag phase similar to those from untreated cells was also observed, regardless of the treatment intensity.

The fraction of resistant cells goes unnoticed when sublethal injury is quantified by the differential plating method, since nearly all surviving cells appear to be sublethally injured according to this method. The discrepancy between both methods is probably due to the fact that the method for the estimation of the length of the lag phase has a limit of detection 10 times lower (1 cell) than the differential plating method (10 cells).

## Resum

Aquest treball ha avaluat el dany subletal i la capacitat de recuperació de cèl·lules individuals de *Listeria monocytogenes* Scott A després del tractament per altes pressions hidrostàtiques (HHP) a 400 MPa i 8°C durant 2, 8 i 20 min. Per això, s'ha estimat la durada de la fase retardària de les cèl·lules a partir de mesures de la densitat òptica de suspensions de cèl·lules individuals i dels recomptes en placa corresponents. Els resultats han posat de manifest que l'augment de la durada del tractament causa l'aparició de cèl·lules lesionades subletalment que necessiten temps de recuperació més llargs que les cèl·lules no tractades per començar a multiplicar-se. No obstant això, i independentment del tractament, també s'ha observat una fracció de cèl·lules resistents amb fases retardàries similars a les de les cèl·lules no tractades.

Aquesta fracció de cèl·lules resistents passa desapercebuda quan es fa la quantificació del dany subletal a partir del mètode de recompte diferencial en placa ja que, en aquest cas, els resultats indiquen que pràcticament totes les cèl·lules supervivents han resultat danyades subletalment. La discrepància entre els dos mètodes probablement és deguda a que el mètode d'estimació de la durada de la fase retardària té un nivell de detecció deu vegades inferior (1 cèl·lula) que el mètode diferencial de recompte en placa (10 cèl·lules).

## 1. Introducció

*Listeria monocytogenes* és un bacil patogen, Gram positiu, mòbil, catalasa positiu i psicròfil que pot créixer en un extens interval de pH i temperatura (Lado, 2007; Rocourt & Buchrieser, 2007). És un microorganisme ubic, moderadament resistent als tractaments tèrmics i amb habilitat per créixer de manera anaeròbica en refrigeració, situació en la qual la competència microbiana es gairebé nul·la (Rocourt & Buchrieser, 2007). Per tant, és necessari controlar la contaminació i el creixement de *L. monocytogenes* durant la producció, envasament i emmagatzematge dels aliments. Els reglaments de la Comunitat Europea N° 2073/2005 (Anonymous, 2005) i N° 1441/2007 (Anonymous, 2007) relatius als criteris microbiològics aplicables a productes alimentaris estableixen els seus límits en aliments llestos per consum (*Ready to eat* o RTE). Així, cal garantir l'absència de *L. monocytogenes* en 25 g fins que l'aliment deixi el control immediat de l'empresa productora, mentre que el límit passa a ser de 100 CFU/g quan es troba en l'etapa de comercialització durant la seva vida útil. En aliments que no afavoreixen el creixement de *L. monocytogenes* ( $\text{pH} \leq 4,4$  o  $a_w \leq 0,92$  o amb  $\text{pH} \leq 5,0$  i  $a_w 0,94$ ) i en aquells amb una vida útil inferior a 5 dies, el seu límit és de 100 CFU/g en totes les etapes. Si l'aliment va destinat a lactants o a usos mèdics especials, s'estableix com a límit l'absència en 25 g en tots els casos.

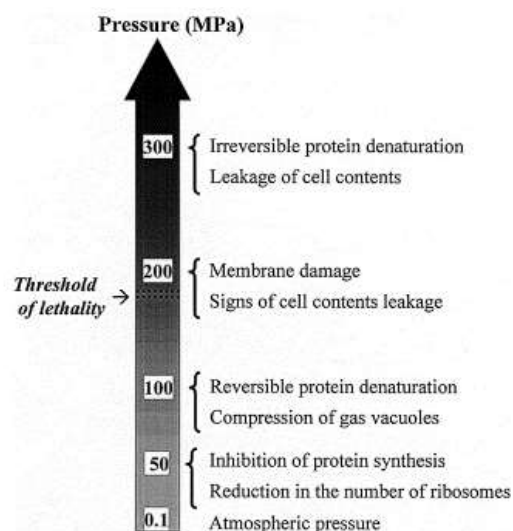
Actualment, els mètodes més comuns per garantir la innocuïtat alimentaria són els tractaments tèrmics, com la pasteurització o l'esterilització, els quals en alguns casos, donen a lloc a canvis no desitjats en les característiques organolèptiques i nutricionals dels aliments. Alternativament, altres mètodes innovadors criden l'atenció de diferents productors per tal d'obtenir aliments segurs que no pateixin canvis importants en aspectes sensorials, nutricionals i funcionals (Sun, 2014).

Entre les tecnologies no tèrmiques, destaca el tractament amb altes pressions. Aquest és conegut com HPP, acrònim de *High Pressure Processing*, o HHP, acrònim de *High Hydrostatic Pressure*. Aquest mètode es basa en l'aplicació d'energia mecànica a un fluid, que comprimeix l'aliment de manera isostàtica. L'objectiu de l'aplicació d'aquesta tecnologia es reduir la càrrega microbiana dels aliments, però evitant al màxim l'alteració de les seves propietats inicials (Sun, 2014).

Per tractar l'aliment per alta pressió, es col·loca en un recipient capaç de suportar la pressió desitjada i el producte es submergeix en un fluid, normalment aigua, que actua com a transmissor de la pressió. En cas que els aliments siguin líquids, pot ser el mateix aliment el

que actui com a fluid transmissor de la pressió. Amb l'ajuda d'una bomba s'arriba a la pressió desitjada, i el sistema la manté durant tot el temps de tractament. La pressió es transmet ràpidament i uniformement a través del fluid cap a l'aliment. L'envàs utilitzat en el procés ha de ser flexible i amb un tancament que garanteixi que no hi hagi interacció entre el producte i l'ambient (Patterson *et al.*, 1999). La presència d'aire redueix l'eficiència del tractament, i per aquesta raó el producte ha d'ocupar el recipient sencer o ser envasat al buit (Mertens, 1993). La inactivació microbiana depèn de la pressió, el temps i la temperatura del tractament. També es veu afectada per la forma, el tipus Gram, l'espècie i la soca del microorganisme, així com el pH, l' $a_w$  i altres característiques del medi (San Martín *et al.*, 2002).

A la *Figura 1*, es presenten els principals efectes dels diferents nivells de pressió sobre els microorganismes. S'observa que el llindar de letalitat es troba aproximadament als 180 MPa, punt a partir del qual la inactivació augmenta exponencialment a mesura que la pressió incrementa. Per sobre d'aquest llindar la majoria de canvis són irreversibles i poden causar la mort de les cèl·lules. En canvi, per sota d'aquesta pressió, els canvis que es produeixen a les cèl·lules durant els tractaments d'HHP són reversibles (Lado & Yousef, 2002).



*Figura 1:* Canvis funcionals i estructurals en els microorganismes a diferents pressions (Lado & Yousef, 2002)

Els mecanismes d'inactivació per HHP són diversos i inclouen la inhibició de l'activitat de l'enzim ATPasa, la cristallització dels fosfolípids de membrana (que provoca canvis irreversibles en la permeabilitat de la cèl·lula) i la interferència en la transcripció, entre d'altres. La intensitat d'aquests canvis en cada cèl·lula determinarà que no hi hagi lesió, o que la lesió sigui letal o subletal, és a dir, que es tradueixi en la inactivació o bé en un allargament de la fase



retardària de la corba de creixement ja que la divisió cel·lular no és possible durant la reparació dels danys (Hoover, 1989; Yuste et al., 2004; Métris *et al.*, 2008).

La quantificació de cèl·lules danyades subletalment es realitza mitjançant el recompte diferencial en placa. Aquest mètode es basa en la suposició que aquestes cèl·lules no poden formar colònies en medis selectius però sí en medis no selectius (Kell *et al.*, 1998). El medi selectiu permet la diferenciació i enumeració d'un microorganisme en concret però, aquest medi conté agents que poden inhibir la reparació i per tant, només aquells microorganismes que no hagin estat danyats hi podran créixer. La diferència entre el recompte en medi no selectiu i selectiu equival al recompte de cèl·lules danyades subletalment (Yuste *et al.*, 2004).

Com s'ha esmentat anteriorment, el dany subletal causa un augment de la durada de la fase retardària. Aquest paràmetre de creixement de la cèl·lula es pot estimar a partir de la modelització de la corba de creixement. Tradicionalment, la fase retardària es defineix a partir de la corba que relaciona la concentració cel·lular amb el temps (*Figura 2a*). El final de la fase retardària és el temps en que la tangent de la fase exponencial de la corba de creixement creua el nivell d'inòcul (Métris *et al.*, 2003).

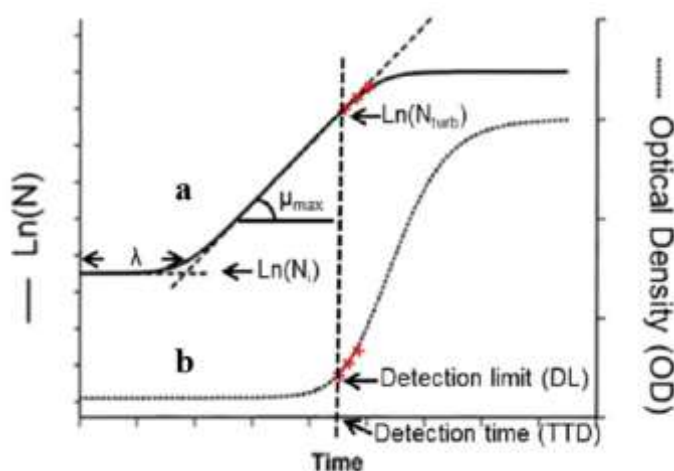
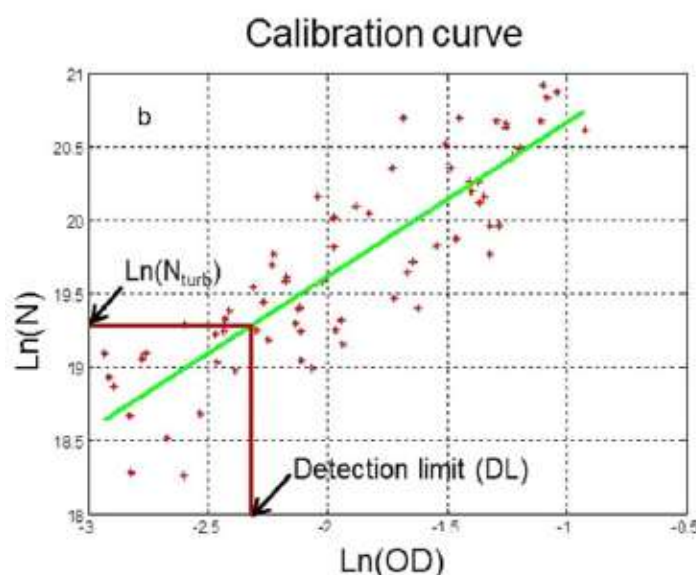


Figura 2: Relació entre els paràmetres de creixement (Baka *et al.*, 2015)

Per tal que l'estimació de la durada de la fase retardària sigui el més acurat possible, és necessari partir d'una gran quantitat de dades que es poden obtenir a partir del recompte en placa però, aquest és un mètode molt laboriós. Com a forma alternativa als recomptes en placa, s'usen mesures de la terbolesa generada pel microorganisme quan creix en un medi de cultiu líquid que, en comparació, resulta un mètode més ràpid i barat (Augustin *et al.*, 1999). L'automatització d'aquestes mesures en turbidímetres que mesuren la terbolesa en

microplaques permet la producció d'un gran nombre de replicats, els quals són vitals per la realització de càlculs que permetin obtenir resultats representatius (Métris *et al.*, 2003).

La densitat òptica (DO) es la relació entre la intensitat de la llum incident i la de la llum transmesa (Koch, 1981). Generalment, s'assumeix que hi ha una relació directa entre la DO i els resultats del recompte en placa (*Figura 3*), però l'interval de valors en que aquesta relació és proporcional és limitat i específic per l'espècie bacteriana i, de vegades, fins i tot per la soca. A causa d'això, l'estimació dels paràmetres de creixement a partir de la DO sol ser errònia, especialment la de la durada de la fase retardària. Tot i que en algunes condicions es poden obtenir bons resultats, alguns investigadors han proposat l'ús del temps de detecció com a alternativa a l'estimació de paràmetres de creixement a partir de tota la corba de DO. El temps de detecció és el temps que una població triga a assolir un nivell detectable de DO (nivell de detecció) (Métris *et al.*, 2003).



*Figura 3:* Corba de calibratge entre el logaritme neperià dels recomptes en placa i la DO (Baka *et al.*, 2015)

Per tal de poder avaluar el temps de recuperació de cèl·lules danyades subletalment, és necessari mesurar la durada de la fase retardària de manera individual. En inòculs superiors a 100 cèl·lules per mil·lilitre, la durada de la fase retardària ve determinada per aquelles cèl·lules que tenen una fase retardària més curta, ja que el seu creixement tapa el d'aquelles amb una fase retardària més llarga (Métris *et al.*, 2006). Baranyi (1998, 2002) i Baranyi & Pin (2001) suggereixen que les durades de les fases retardàries individuals poden ser més llargues i heterogènies en comparació a les de la població i, conseqüentment, no es pot deduir la distribució de durades de les retardàries individuals a partir de la corba de creixement de la població.

El Bioscreen C és un turbidímetre automatitzat que permet monitoritzar la DO de fins a 200 pous. Mitjançant dilucions seriades, es pot inocular aproximadament una cèl·lula per pou i això permet avaluar de manera individual el temps necessari per reparar-se. Si considerem que la velocitat específica de creixement és la mateixa en cada pou i en cada pou hi ha una sola cèl·lula, llavors el temps de detecció és un valor desplaçat de la durada de la fase retardària de cada cèl·lula única inicial (Métris *et al.*, 2006). Baranyi *et al* (2009) proporciona un mètode que permet estimar la durada de la fase retardària a partir del càlcul del temps de detecció, la concentració cel·lular en el nivell de detecció, el nombre inicial de cèl·lules per pou i la velocitat específica de creixement.

L'objectiu del present treball és avaluar el dany subletal i la capacitat de recuperació de *L. monocytogenes* després d'un tractament per altes pressions hidrostàtiques. Per assolir aquest objectiu, s'obtindran corbes de creixement a partir de suspensions de cèl·lules individuals mesurant la DO mitjançant el Bioscreen C per tal de calcular la durada de la fase retardària de cèl·lules tractades per alta pressió.

## 2. Materials i Mètodes

### 2.1 Soca i condicions de cultiu

Es va usar *L. monocytogenes* Scott A CIP 103575 (*Collection de l'Institut Pasteur*, Paris, França). La soca va ser subministrada en forma de liòfil i es va conservar a -80°C en brou de triptona soja (*Tryptone soya broth* o TSB) amb un 87% v/v de glicerol.

Es va preparar un cultiu d'aquesta soca en medi TSB (Oxoid Ltd., Basingstoke, Regne Unit) amb 0,6 % (p/v) d'extracte de llevat (TSBYE, Oxoid) incubant a 37°C durant 24 hores amb agitació constant (80 rpm). Passat aquest temps, es va fer una dilució 1:100 en brou fresc i es va incubar en les mateixes condicions durant 18 h per tal d'assolir la fase de creixement estacionari. Després del període d'incubació, es van obtenir aproximadament 10<sup>9</sup> CFU/ml.

### 2.2 Calibratge de la densitat òptica amb cèl·lules no tractades

El cultiu en fase estacionària es va diluir seriadament amb TSB suplementat amb 1% (p/v) de glucosa (Panreac Química S.L.U, Castellar del Vallés, Espanya) i 0,3% (p/v) d'extracte de llevat (TSYGB) per arribar a una concentració de 10<sup>6</sup> CFU/ml. Es van afegir 50 µl d'aquesta dilució en cada pou d'una placa multipou i s'hi van afegir 250 µl de TSYGB. Es va mesurar la DO a 37°C en el Bioscreen C (Labsystems, Vantaa, Finland) a una longitud d'ona de 600 nm durant 24 h. L'aparell va fer una lectura de la DO cada 10 min després de 5 min d'agitació d'intensitat mitjana.

Cada hora, durant 8 hores, es va agafar mostra d'un pou de la placa de Bioscreen C i es va diluir en solució salina fisiològica amb peptona (*Peptone physiological salt solution* o PPS, Oxoid). Cinquanta µl d'aquestes dilucions es van sembrar en plaques de petri que contenien agar triptona soja (*Tryptone soya agar* o TSA, Oxoid) suplementat amb extracte de llevat al 0,6% (p/v) (TSAYE) amb un sembrador en espiral (IUL, Barcelona, Espanya). Les plaques es van incubar durant 24-48 h a 37°C.

A partir dels recomptes en placa i les lectures de DO es va obtenir la corba de calibratge on es va representar el log CFU/ml respecte la DO. Aquest experiment es va realitzar per triplicat.

### 2.3 Tractaments d'alta pressió hidrostàtica

#### 2.3.1 Tractament de les mostres

Una ampolla de plàstic de 40 ml amb tap de rosca (SciLabware, Stanffordshire, Regne Unit) es va omplir amb cultiu en fase estacionària assegurant l'absència d'aire i el tancament hermètic.

La mostra es va envasar al buit en doble bossa de plàstic (Deltalab, Rubí, Espanya) i es va refredar i mantenir en gel (aproximadament 8°C) fins el moment del tractament. A continuació, es va introduir a l'equip temperat a 8°C i es va esperar 5 min per equilibrar la seva temperatura. El tractament va consistir en una rampa automàtica de pujada de pressió fins a 400 MPa, que es va mantenir durant 2, 8 o 20 minuts.

### 2.3.2 Avaluació del creixement en medi líquid i sòlid

Després del tractament, es van realitzar dilucions seriades en TSYGB de la mostra tractada fins a obtenir aproximadament 20 CFU/ml. Es van afegir 50 µl d'aquesta última suspensió i 250 µl de TSYGB en cada pou de la placa de Bioscreen C amb l'objectiu d'obtenir ~1 cèl·lula per pou. Per tal de tenir un nombre representatiu de pous, es van inocular dues plaques de Bioscreen C (200 pous en total). Les condicions de l'equip van ser les mateixes que les de les corbes de calibratge de les cèl·lules no tractades i la incubació es va fer durant 48 h. Aquest procediment es va aplicar també a un cultiu no tractat per tal d'obtenir la durada de la fase retardària característica de cèl·lules no danyades.

Per comprovar el nombre de cèl·lules que s'estaven inoculant als pous de la placa de Bioscreen C, el cultiu mare es va diluir en TBYGB fins obtenir ~20 CFU/ml, se'n van sembrar 300 µl en 10 plaques de TSAYE i es van incubar a 37°C durant 24-48 h.

Per obtenir els recomptes en placa del cultiu no tractat i de la mostra tractada, es van realitzar dilucions seriades en PPS i se'n van sembrar 50 µl en TSAYE. El recompte de cèl·lules del cultiu no tractat va permetre per una banda, calcular la inactivació i, per l'altra, comprovar que els valors dels diferents experiments eren semblants. Per poder realitzar el recompte diferencial en placa, la mostra tractada es va sembrar a més en Brilliance *Listeria* (Oxoid). Cada dilució es va sembrar per duplicat i les plaques es van incubar durant 24-48 h a 37°C.

Per cada tractament, el recompte en placa en medi selectiu i no selectiu es va utilitzar per calcular:

- Inactivació: és la diferència entre el recompte inicial ( $N_0$ ) i final ( $N$ ) expressat en logaritme.

$$\text{Inactivació} = \log\left(\frac{N}{N_0}\right)$$

- Dany subletal: és la diferència expressada en percentatge entre el recompte en medi no selectiu i el selectiu.

$$\%DS = \left( \frac{\text{recompte medi no selectiu} - \text{recompte medi selectiu}}{\text{recompte medi no selectiu}} \right) \times 100$$

## 2.4 Mètode lineal d'estimació de la fase retardària de cèl·lules individuals

Les durades de la fase retardària de cèl·lules no tractades i tractades per alta pressió es van calcular mitjançant la següent equació (Baranyi *et al.*, 2009):

$$L_g^{(LIN)} = T_{det}(N_0) - \frac{Y_{det} - \ln(\hat{\rho})}{\mu}$$

- $L_g^{(LIN)}$  és l'estimació de la durada de la fase retardària.
- $T_{det}(N_0)$  és el temps de detecció calculat a partir de la corba de creixement (DO).
- $Y_{det}$  és el logaritme neperià de la concentració cel·lular al límit de detecció de la DO (constant).
- $\hat{\rho}$  és l'estimació del nombre inicial de cèl·lules per pou.
- $\mu$  és la velocitat específica de creixement (constant).

Per poder calcular el paràmetre de creixement  $\mu$ , es va realitzar la representació gràfica del logaritme neperià dels recomptes en placa de cèl·lules no tractades respecte el temps. Seguidament, es va calcular el seu valor ajustant el model de Baranyi-Roberts (Roberts & Baranyi, 1994) amb l'eina GraphPad Prism (versió 8 per Windows, San Diego, California, USA). A més, es va realitzar una predicció d'aquest paràmetre amb ComBase (<https://www.combase.cc/tools>) per comprovar que era semblant al valor experimental.

El paràmetre  $\hat{\rho}$  es va calcular tant pels diferents tractaments com pel cultiu no tractat amb la fórmula que es presenta a continuació:

$$\hat{\rho} = -\ln\left(\frac{W_0}{W}\right)$$

on  $W$  és el nombre total de pous ( $W=200$ ) i  $W_0$  el nombre de pous sense creixement.

Tal com s'ha detallat anteriorment, el límit de detecció correspon al valor d'OD en el qual es detecta un canvi de senyal produït per el creixement microbià (Baka *et al.*, 2015). Aquest límit normalment ve determinat per les característiques tècniques del turbidímetre però, a més, cal tenir en compte altres criteris per tal de fixar el seu valor i adaptar-lo a les condicions experimentals en cada cas. Així doncs, el seu valor ha de ser major que el primer senyal de DO que es troba en la zona lineal de la corba de creixement microbià però, a la vegada, ha de ser inferior a 0.3 unitats degut a la pèrdua de linealitat de l'equació de Beer per sobre d'aquest

llindar. A partir de la interpolació del límit de detecció seleccionat en les corbes de calibratge, es va determinar el paràmetre  $Y_{\text{det}}$ .

El temps de detecció  $T_{\text{det}}$  es va calcular per cada pou on hi havia hagut creixement tant de les mostres no tractades com les tractades per HPP, ajustant el model de Baranyi-Roberts (Roberts & Baranyi, 1994) i interpolant-hi el valor de OD corresponent al límit de detecció prèviament seleccionat.

### 3. Resultats i Discussió

#### 3.1 Inactivació i dany subletal de *Listeria monocytogenes* Scott A tractada a 400 MPa

A partir dels recomptes en placa en medi no selectiu (TSAYE) i selectiu (Brilliance *Listeria*) es va calcular la inactivació i el dany subletal (%DS) (Figura 4). D'una banda, la inactivació calculada a partir dels recomptes en TSAYE va ser de  $3,73 \pm 0,56$  log quan el tractament era de 2 min, mentre que va arribar a  $6,74 \pm 0,70$  i  $8,16 \pm 0,07$  pels tractaments amb una durada de 8 i 20 min. D'altra banda, la inactivació calculada a partir dels recomptes en Brilliance *Listeria* va ser de  $5,66 \pm 0,22$ ;  $9,55 \pm 0,01$  i  $9,70 \pm 0,27$  pels tractaments de 2, 8 i 20 min, respectivament. Tenint en compte que aquest medi conté agents que poden inhibir el creixement de les cèl·lules lesionades, aquesta diferència denota la presència de cèl·lules danyades subletalment.

Així doncs, el %DS, calculat com la diferència entre els recomptes en medi no selectiu i el selectiu, va ser aproximadament d'un 100% per tots els tractaments, cosa que implica que pràcticament totes les cèl·lules supervivents van resultar danyades subletalment independentment de la durada del tractament.

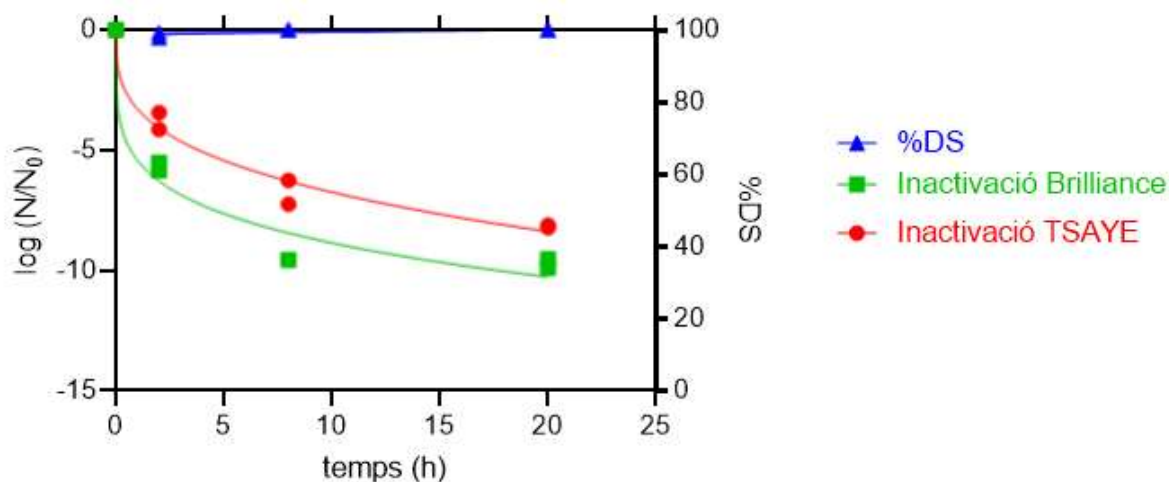


Figura 4: Letalitat i dany subletal de *Listeria monocytogenes* Scott A tractada a 400 MPa

#### 3.2 Aplicació del mètode lineal d'estimació de la durada de la fase retardària

##### 3.2.1 Càlcul de $\mu$

El valor  $\mu$  es va obtenir a partir de la representació gràfica del logaritme neperià dels recomptes en placa de cèl·lules no tractades respecte el temps i ajustant el model de Baranyi-Roberts. Es va obtenir un valor de  $1,149 \ln \text{CFU/ml} \cdot \text{h}^{-1}$  i un  $R^2$  de 0,9892.



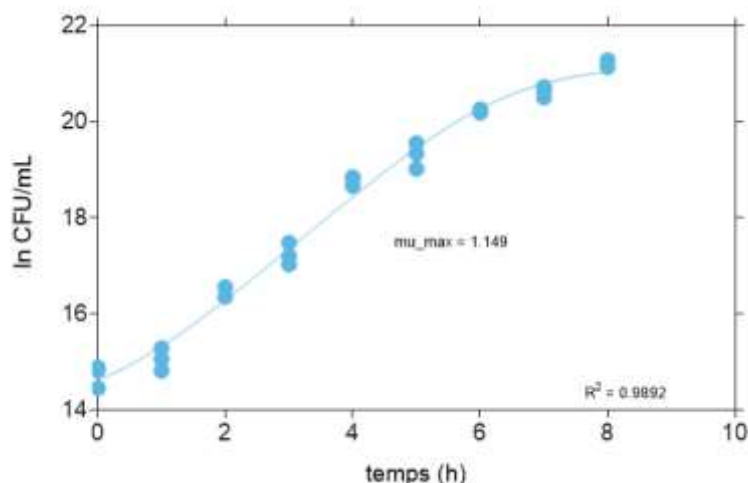


Figura 5: Ajust de la corba de creixement de *Listeria monocytogenes* Scott A obtinguda a partir de recomptes en placa al model de Baranyi-Roberts

Mitjançant el mòdul de predicció de ComBase, es va fer una predicció del valor de  $\mu$  per comprovar si el resultat trobat de manera experimental era semblant al valor calculat en aquest treball. Els valors de temperatura, pH i contingut de NaCl (%) es van fixar a 37°C, 7,0 i 2,5%, respectivament, ja que corresponen a les condicions de creixement de les cèl·lules en el brou TSYGB. Es va obtenir un valor de 1,108 ln CFU/ml·h<sup>-1</sup>, sent aquest molt pròxim a l'obtingut de manera experimental.

### 3.2.2 Càlcul de $\hat{\rho}$

El paràmetre  $\hat{\rho}$  es va calcular tant pel cultiu no tractat com pels diferents tractaments amb la fórmula presentada a l'apartat de Materials i Mètodes. Tal com s'observa a la *Taula 1*, el nombre inicial de cèl·lules per pou va estar entre 1 i 2 excepte pel tractament de 20 min, donada la major inactivació que va causar un augment del número de pous sense creixement.

Taula 1: Estimació del número inicial de cèl·lules de *Listeria monocytogenes* Scott A a cada pou

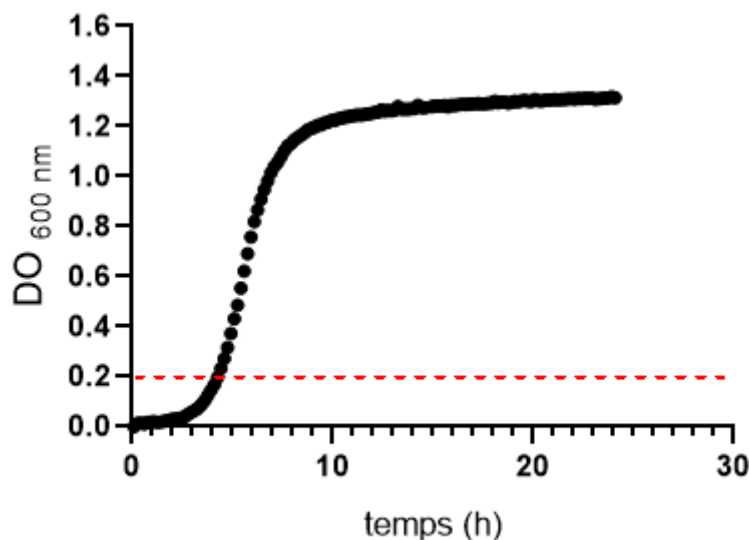
Tractament a 400 MPa	$\hat{\rho}$ (Cèl·lules/pou)
Control	2,29±1,60
2 min	1,12±0,0
8 min	1,58±0,0
20 min	0,09±0,02

Es va realitzar una comprovació del número inicial de cèl·lules per pou sembrant en placa del cultiu mare diluït després del tractament per determinar si hi havia concordança amb els valors

obtinguts de  $\hat{\rho}$ . Es van obtenir  $0,85 \pm 1,51$ ,  $1,10 \pm 0,0$ ,  $1,30 \pm 0,0$  i  $0,36 \pm 0,85$  cèl·lules inicials per pou pel cultiu no tractat i pels tractats durant 2, 8 i 20 min, respectivament. En general, aquests recomptes són homogenis i concorden amb el número estimat.

### 3.2.3 Càlcul de $Y_{\text{det}}$

A partir d'una corba de creixement tipus, on es representa la DO respecte el temps, es va establir el límit de detecció en 0,2 unitats (*Figura 6*). Dalgaard & Koutsoumanis (2001), Bidlas *et al.*, (2008), Skåra *et al.*, (2011) i Mytilinaios *et al.*, (2012) també van fer servir aquest límit de detecció en els seus estudis, mentre que Métris *et al.*, (2006), Baranyi & Pin (1999) i Jenkins *et al.*, (2000), van fer servir valors de 0,11, 0,15 i 0,3 unitats, respectivament.



*Figura 6:* Corba de creixement tipus de *Listeria monocytogenes* Scott A a partir de la qual s'estableix el límit de detecció de la DO

Per tal de determinar  $Y_{\text{det}}$  es va interpolar el límit de detecció de 0,2 unitats en la corba de calibratge que s'obté a partir de la representació gràfica de la DO i el ln dels recomptes en TSAYE de cèl·lules no tractades (*Figura 7*). Per aquest valor de DO,  $Y_{\text{det}}$  va correspondre a 18,69 ln UFC/ml, amb un ajust de  $R^2 = 0,947$ .

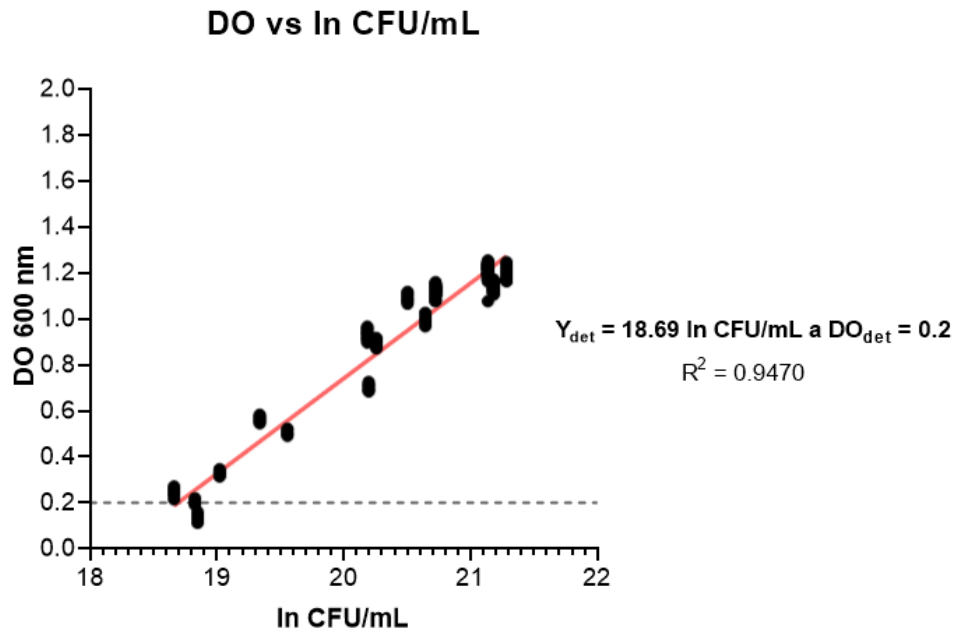


Figura 7: Corba de calibratge de la DO amb el recompte en placa corresponent al creixement de *Listeria monocytogenes* Scott A

### 3.2.4 Càlcul de $T_{det}$

Per realitzar el càlcul de  $T_{det}$  de les cèl·lules no tractades i tractades, el model de Baranyi-Roberts es va ajustar per tots els pous on hi havia hagut creixement segons el Bioscreen C. La Figura 8 mostra un diagrama de dispersió de tots els temps de detecció de les poblacions originades a partir de cèl·lules individuals no tractades i tractades. Per tal de tenir més informació dels diferents valors obtinguts, es va determinar tant la mediana com els màxims i mínims dels diferents tractaments.

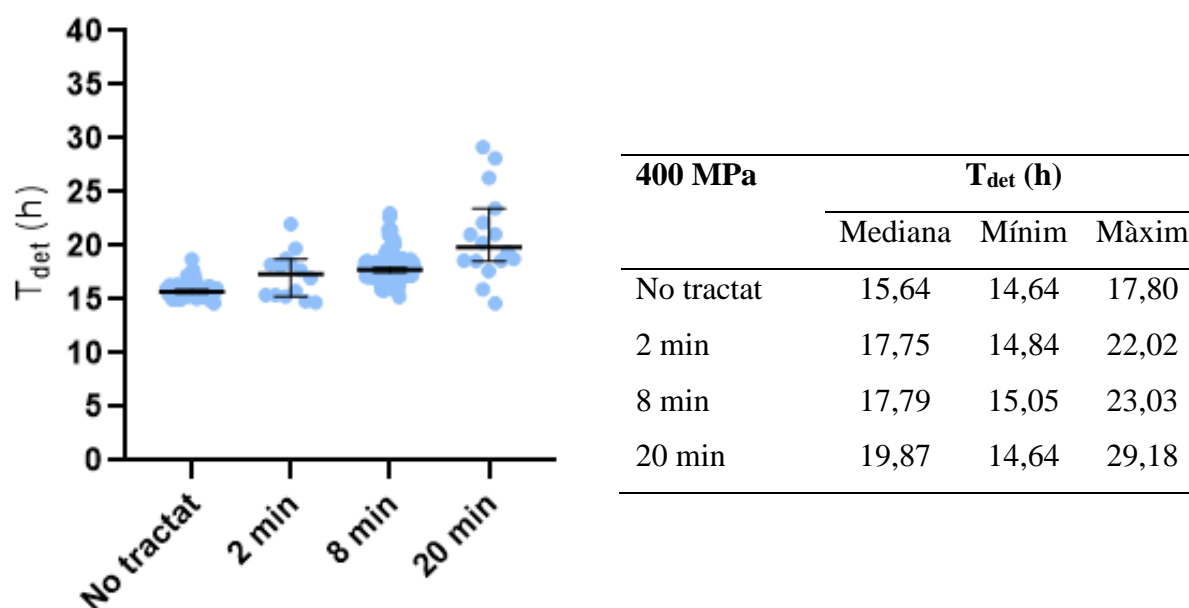


Figura 8: Diagrama de dispersió dels temps de detecció ( $T_{det}$ ) de les poblacions generades a partir de cèl·lules individuals de *Listeria monocytogenes* Scott A no tractades i tractades a 400 MPa. Els valors mínims, màxims i medianes es mostren a la taula adjacent. Les línies mostren la mediana i el seu interval de confiança al 95%.

Les medianes dels temps de detecció van augmentar en les mostres tractades i a mesura que va augmentar el temps de tractament. Algunes cèl·lules lesionades van necessitar entre 22 i 29 h per donar lloc a poblacions detectables, degut a que van necessitar períodes de temps més llargs per reparar-se i començar a multiplicar-se. D'altra banda, l'homogeneïtat dels valors mínims de temps de detecció entre cèl·lules tractades i no tractades indica la presència de cèl·lules no danyades malgrat el tractament per alta pressió.

### 3.3 Durada de la fase retardària ( $L_g$ ) de cèl·lules individuals de *Listeria monocytogenes* Scott A tractada a 400 MPa

A partir dels paràmetres calculats en els apartats anteriors, es va estimar la durada de la fase retardària de cada cèl·lula per cada temps de tractament mitjançant el mètode lineal (Figura 9). Novament, es va determinar tant la mediana com els màxims i mínims corresponents als diferents tractaments per tal de disposar de més informació.

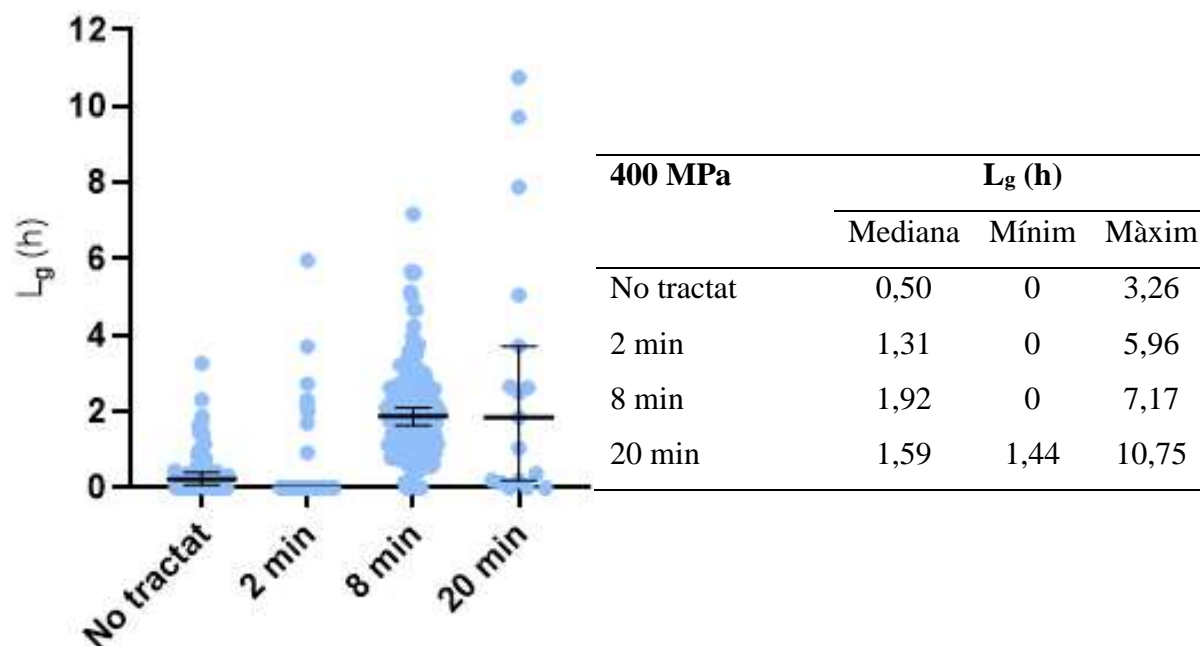


Figura 9: Diagrama de dispersió de la durada de la fase retardària ( $L_g$ ) de cèl·lules individuals de *Listeria monocytogenes* Scott A no tractada i tractada a 400 MPa. Els valors mínims, màxims i medianes es mostren a la taula adjacent.

La mediana de la durada de la fase retardària d'una cèl·lula no tractada va ser de 30 min, mentre que, per les cèl·lules tractades, les medianes es van situar entre 1,31 i 1,92 h. Els valors mínims indiquen que entre les cèl·lules no tractades i les tractades a 2 i 8 min, n'hi va haver algunes que no van necessitar un temps de recuperació, mentre que els valors màxims posen de manifest la presència de cèl·lules intensament danyades amb fases retardàries de fins a 10,75 h. A més, el diagrama mostra que a mesura que va augmentar el temps de tractament, el comportament de les cèl·lules va ser més heterogeni.

El percentatge de pous amb creixement va ser del 85%, 67,4%, 76,5% i 8% per cèl·lules no tractades i tractades durant 2, 8, 20 min, respectivament. Aquests valors concorden amb els recomptes en placa comentats anteriorment. En canvi, els valors de %DS calculats a partir dels recomptes en placa indiquen que la totalitat de la població supervivent després de 8 i 20 min està danyada subletalment, mentre que l'estimació de la durada de la fase retardària de les cèl·lules individuals evidencia la presència d'algunes cèl·lules supervivents amb capacitat de multiplicar-se immediatament després del tractament. Aquesta diferència és deguda probablement a que el límit de detecció del mètode de recompte diferencial en placa és de 10 cèl·lules, mentre que el límit de detecció del mètode d'estimació de la durada de la fase retardària és d'una cèl·lula.

#### **4. Conclusions**

Els tractaments a 400 MPa durant 8 i 20 min de *Listeria monocytogenes* Scott A aconseguixen inactivacions considerables. Tot i això, l'estudi de la durada de la fase retardària de cèl·lules individuals supervivents posa de manifest l'existència d'una fracció de cèl·lules resistents amb capacitat de multiplicar-se immediatament i, a la vegada, la d'una fracció de cèl·lules lesionades subletalment que necessiten temps de recuperació més llargs que les anteriors. Aquests resultats senyalen la importància de validar els tractaments d'HHP quan s'apliquen amb la finalitat de garantir la innocuïtat dels aliments.

El mètode d'estimació de la durada de la fase retardària presenta avantatges respecte el mètode de recompte en placa degut a que permet disminuir el nivell de detecció i mostrar l'heterogeneïtat del comportament de les cèl·lules supervivents.

## 5. Bibliografia

- Anonymous (2005). Commission regulation (EC) N° 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*.
- Anonymous (2007). Commission regulation (EC) N° 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) N° 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*.
- Augustin, J.-C., Rosso, L., & Carlier, V. (1999). Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods*, 38(1), 137–146.
- Baka, M., Noriega, E., Stamati, I., Logist, F., & Van Impe, J. F. M. (2015). Critical assessment of the time-to-detection method for accurate estimation of microbial growth parameters. *Journal of Food Safety*, 35(2), 179–192.
- Baranyi, J. (1998). Comparison of stochastic and deterministic concepts of bacterial lag. *Journal of Theoretical Biology*, 192(3), 403–408.
- Baranyi, J. (2002). Stochastic modelling of bacterial lag phase. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2–3), 203–206.
- Baranyi, J., George, S. M., & Kutalik, Z. (2009). Parameter estimation for the distribution of single cell lag times. *Journal of Theoretical Biology*, 259(1), 24–30.
- Baranyi, J., & Pin, C. (1999). Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 732–736.
- Baranyi, J., & Pin, C. (2001). A parallel study on bacterial growth and inactivation. *Journal of Theoretical Biology*, 210(3), 327–336.
- Bidlas, E., Du, T., & Lambert, R. J. W. (2008). An explanation for the effect of inoculum size on MIC and the growth/no growth interface. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 140–152.
- Dalgaard, P., & Koutsoumanis, K. (2001). Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal of Microbiological Methods*, 43, 183–196.

- Hoover, D. G. (1989). Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technology (USA)*, 43(3), 99–107.
- Jenkins, P., Poulos, P. G., Cole, M. B., Vandenvan, M. H., & Legan, J. D. (2000). The boundary for growth of *Zygosaccharomyces bailii* in acidified products described by models for time to growth and probability of growth. *Journal of Food Protection*, 63(2), 222–230.
- Kell, D. B., Kaprelyants, A. S., Weichert, D. H., Harwood, C. R., & Barer, M. R. (1998). Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(2), 169–187.
- Koch, A.L (1981). *Growth measurement*. (R. N. C. P. Gerhardt, R.G.E. Murray, Ed.), *Manual of Methods for General Bacteriology*. Washington, DC : American Society for Microbiology.
- Lado, B. H. (2007). Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety, Third Edition*, 157–214.
- Lado, B. H., & Yousef, A. E. (2002). Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection*, 4(4), 433–440.
- Mertens, B. (1993). Packaging aspects of high-pressure food processing technology. *Packaging Technology and Science*, 6(1), 31–36.
- Métris, A., George, S. M., & Baranyi, J. (2006). Use of optical density detection times to assess the effect of acetic acid on single-cell kinetics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), 6674–6679.
- Métris, A., George, S. M., Mackey, B. M., & Baranyi, J. (2008). Modeling the variability of single-cell lag times for *Listeria innocua* populations after sublethal and lethal heat treatments. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(22), 6949–6955.
- Métris, A., George, S. M., Peck, M. W., & Baranyi, J. (2003). Distribution of turbidity detection times produced by single cell-generated bacterial populations. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 821–827.
- Mytilinaios, I., Salih, M., Schofield, H. K., & Lambert, R. J. W. (2012). Growth curve prediction from optical density data. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 169–176.



- Patterson, M. F., Linton, M., & McClements, J. M. J. (1999). *Pathogen Inactivation by High Pressure Treatment of Foods*. In: Ludwig H. (eds) *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology*, 105-108. Berlin: Springer.
- Roberts, T. A., & Baranyi, J. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277–294.
- Rocourt, J., & Buchrieser, C. (2007). *Listeria, listeriosis, and food safety*. (E. T. Ryser & E. H. Marth, Eds.) (Third Edition). London: CRC Press.
- San Martín, M. F., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. (2002). Food Processing by High Hydrostatic Pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(6), 627–645.
- Skåra, T., Cappuyns, A. M., Van Derlinden, E., Rosnes, J. T., Valdramidis, V. P., & Impe, J. F. Van. (2011). Quantifying the combined effect of salt and temperature on the growth of *Listeria* strains isolated from salmon and salmon processing environments. *Procedia Food Science*, 1, 1001–1006.
- Sun, D.-W. (2014). *Emerging technologies for food processing* (Second Edition). San Diego, California: Elsevier academic.
- Yuste, J., Capellas, M., Fung, D. Y. C., & Mor-Mur, M. (2004). Inactivation and sublethal injury of foodborne pathogens by high pressure processing: Evaluation with conventional media and thin agar layer method. *Food Research International*, 37(9), 861–866.